

## ADIÇÃO DE NaCl EM SOLUÇÕES FIXADORAS – OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS

ARESTIDES M. NACHI\*  
IVAN G. PIZA\*\*

Doação à Biblioteca da UEL, deixada  
pela professora do Departamento de  
Educação, Dra. Vani Ruiz Viessi. 1987

### RESUMO

*Análise comparativa entre os resultados obtidos após fixação com formol neutro a 10% e com Bouin (convencional) e os resultados obtidos após fixação com essas mesmas soluções acrescidas de NaCl na concentração de 0,7%. O órgão-objeto de análise foi a glândula salivar submandibular do rato e os resultados foram avaliados após colorações de H-E e tricrômico de Mallory e, ainda, mediante técnicas Histoquímicas para mucosubstâncias e proteínas.*

### 1 – INTRODUÇÃO

Embora pouco se conheça sobre os mecanismos de ação dos fixadores químicos e a natureza da fixação em si, a observação tem evidenciado que os resultados em uma pesquisa podem apresentar variações na dependência do tipo de fixador utilizado bem como das condições de fixação. Tais variações são, hoje, reconhecidas, algumas tendo, já, sido demonstradas experimentalmente, o que se retrata em várias publicações<sup>(2, 8, 9, 10, 11)</sup>.

Tais considerações têm levado a se adotar sistematicamente, em pesquisa laboratorial, a análise prévia do órgão a ser estudado, frente a sua reação a diferentes fixadores e em diferentes condições de fixação, de modo a se obter, antes de se efetuar a pesquisa propriamente dita, o melhor padrão de fixação para o órgão-objeto da investigação, nas condições que a referida investigação exija.

A par dessa ação, já largamente aceita, tem-se proposto novas variantes na formulação de soluções fixadoras, uma das quais tem sido a introdução, em misturas fixadoras, de diferentes sais não utilizados nas fórmulas tradicionais.

São exemplos de experimentações nesse particular os trabalhos de BIRGE & TIBBITTS<sup>(1)</sup>, PAEGLE<sup>(7)</sup> e ROSS<sup>(9)</sup>.

Sendo o formol e a solução de BOUIN, os dois fixadores mais comu-

mente utilizados em Histologia, decidiu-se efetuar uma análise de resultados obtidos com esses dois fixadores acrescidos de cloreto de sódio a 0,7%, segundo pesquisa efetuada por BIRGE & TIBBITTS<sup>(1)</sup> em que os resultados foram analisados em termos morfo-métricos.

Nesta investigação, optou-se pela tentativa de avaliar os resultados em termos de qualidade da fixação e, principalmente, em termos de qualidade da coloração resultante após tratamento com as diferentes soluções fixadoras.

Elegeu-se para essa análise, as glândulas salivares submandibulares do rato por serem órgãos constantemente estudados nos laboratórios de Histologia da UEL, oferecendo assim maior segurança para análise.

### 2 – MATERIAL E MÉTODOS

Para a presente investigação, foram utilizadas as glândulas salivares submandibulares de um rato (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) macho, adulto, criado no biotério da disciplina de Histologia.

O animal foi sacrificado após jejum de 12 horas por inalação de éter etílico, procedendo-se, a seguir, à dissecação da região cervical e retirada de ambas as glândulas submandibulares.

Quatro fragmentos de tamanho aproximadamente iguais dos órgãos retirados, foram distribuídos entre as quatro soluções fixadoras: formol neutro (10%),

formol neutro com sal (NaCl a 0,7%), Bouin e Bouin com sal (*idem*).

Os fragmentos permaneceram nas respectivas soluções fixadoras por 24 horas, após o que, o material fixado em formol foi lavado em água corrente durante 24 horas e o material fixado em Bouin foi transferido para álcool 70<sup>o</sup>. durante igual período. Seguiram-se os procedimentos habituais de desidratação, diafranização, impregnação e inclusão em parafina, tendo-se tratado os vários fragmentos com os mesmos tempos e incluídos em um só bloco.

Foram obtidos cortes em 7 micrômetros de espessura e submetidos às colorações pela hematoxilina e Eosina e pelo tricrômico de Mallory. Para avaliação, frente às reações histoquímicas, foram efetuados: métodos do ácido periódico-Schiff, para mucosubstâncias neutras, segundo MACMANUS<sup>(6)</sup>; método do Alcian Blue a pH 2,5 para mucosubstâncias ácidas, segundo LISON<sup>(4)</sup>; método para caracterização do radical beta-indolila (triptofano) de LISON & PINHEIRO<sup>(5)</sup>.

### 3 – RESULTADOS

Para os objetivos do presente trabalho, a análise dos resultados, será limitada aos componentes da glândula submandibular mais expressivos, como: ácido, ducto granuloso e ducto estriado.

3.1. coloração pela Hematoxilina-Eosina  
3.1.1. Corte do material fixado pelo formol neutro

\* Estagiário da Disciplina de Histologia, pelo programa "Bolsa de trabalho e pesquisa-convênio MEC/DAE/FUEL", no período de janeiro a julho de 1980.

\*\* Professor Titular de Histologia - Orientador.

Os ácinos apresentam-se regularmente distribuídos. Pouco espaço periácinar. Seus núcleos apresentam-se hiperconcentrados e mal delimitados, sendo difícil a visualização da cromatina.

Os ductos granulados apresentam-se com uma preservação deficiente, tanto no citoplasma como dos limites das células, mas com granulação evidente. A luz desses ductos apresenta-se sem limites precisos.

Nos ductos estriados, o citoplasma das células também apresentou falhas na preservação, mas com boa visualização das estrias na parte basal.

### 3.1.2. Corte do material fixado pelo formol neutro com sal

Os ácinos apresentam boa preser-

vação, semelhante à dos ácinos do corte anterior.

Os ductos granulados apresentam-se com boa preservação, melhor do que com o formol neutro, mantendo-se mais regulares nos seus tamanhos e na coloração. A preservação dos grânulos, nessas células, é acentuadamente melhor.

Os ductos estriados apresentam-se melhor preservados do que no corte com o formol neutro, tanto nos seus limites estruturais, como a sua luz, citoplasma e núcleo. A visualização da cromatina é melhor do que com o corte com formol neutro.

### 3.1.3. Corte do material fixado pelo Bouin

Os ácinos, embora bem delimitados, são circundados por bastante espaço periácinar, indicando forte retração.

A coloração nos ácinos é apenas satisfatória. Nas células acinosas aparecem vacúolos. Os núcleos apresentam boa preservação com limites e cromatina bastante nítidos.

Os ductos granulados apresentam-se bem preservados, quanto aos limites celulares e com luz definida. Seus núcleos apresentam boa preservação, sendo a cromatina bem visível.

Entretanto, a granulação é praticamente invisível.

Os ductos estriados apresentam boa coloração com cromatina bem visível.

### 3.1.4. Corte do material fixado pelo Bouin com sal.

É bastante reduzido o espaço periácinar.

Os ácinos apresentam-se, tanto na preservação como na coloração, melhor do que com o Bouin, mas menos satisfatórios do que aqueles fixados pelo formol com sal. Também aqui, ocorrem vacúolos. Os núcleos estão melhor preservados do que com o Bouin.

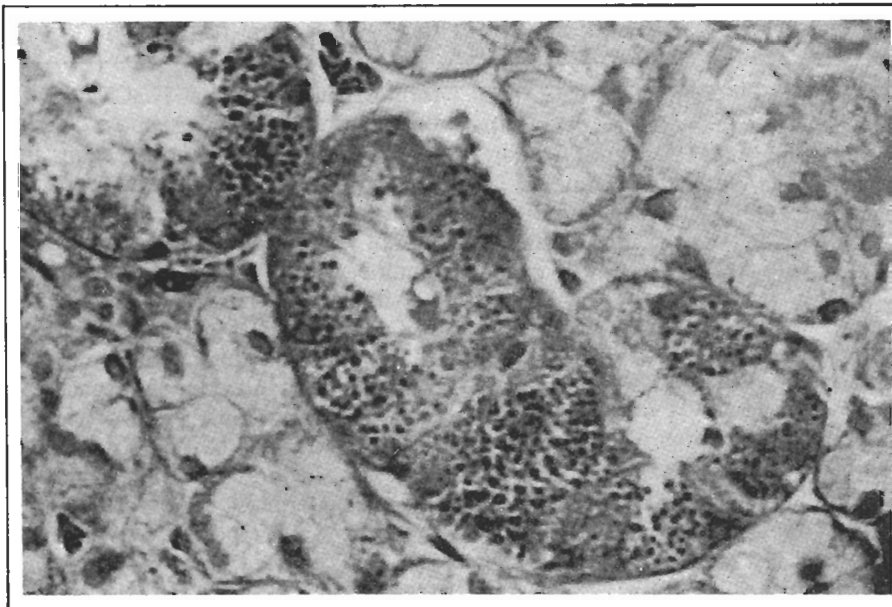


Fig. 1 —  
Material fixado  
em formol  
neutro.  
Coloração  
de Mallory.  
1200X

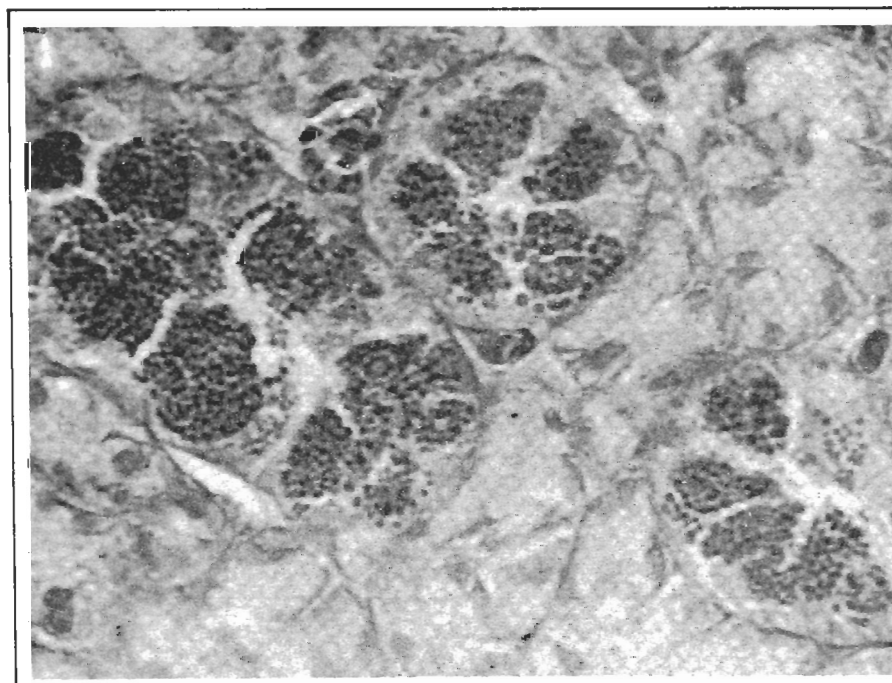


Fig. 2 —  
Material fixado  
em formol  
neutro,  
acrescido de NaCl  
a 0,7%.  
Coloração de  
Mallory.  
1200X

Os ductos granulados apresentam boa preservação, com limites bem delimitados. Em todos os aspectos se assemelham aos ductos do corte com Bouin, destacando-se também a boa coloração e preservação dos seus núcleos. A coloração desses ductos resultou melhor do que nos cortes anteriores. Os grânulos se fazem visíveis mas em muito menor quantidade e com menor intensidade de cor do que a dos cortes fixados em formol.

Os ductos estriados exibiram boa preservação, com luz bem delimitada, estrias bem definidas e limites bem

preservados. A cromatina é bem visível, semelhante ao corte com Bouin.

### 3.2. Após coloração pelo tricrômico de Mallory

#### 3.2.1. Corte do material fixado pelo formol neutro

Os ácinos apresentam-se não muito bem corados. Nos ductos granulados, este método de coloração evidencia ainda mais a deficiência na preservação, notando-se claramente áreas de ruptura e extravazamento de grânulos. Estes estão bem corados (fig. 1). Nos ductos estriados a coloração nuclear não é

boa mas a estriação basal está bem evidenciada.

#### 3.2.2. Corte do material fixado pelo formol neutro com sal

Os ácinos estão corados mais fortemente, tanto quanto os núcleos de suas células. Nos ductos granulados o aspecto é melhor do que no corte anterior, destacando-se uma granulação muito bem preservada e corada (fig. 2). Nos ductos estriados os resultados são idênticos aos do corte anterior.

#### 3.2.3. Corte fixado pelo Bouin

A coloração do Mallory realça os espaços periacinares observados com H-E. A coloração dos ácinos deixa a desejar. Os ductos granulados apresentam-se com má coloração, sem evidência de grânulos (fig. 3). Nos ductos estriados nota-se menor intensidade de cor nas estriações.

#### 3.2.4. Corte do material fixado pelo Bouin com sal

Os ácinos exibiram coloração melhor em relação ao corte fixado pelo Bouin. Nos ductos granulados a coloração é boa com evidência de pequena quantidade de grânulos (fig. 4). Nos ductos estriados a coloração é semelhante à do corte anterior.

Fig. 3 —  
Material fixado  
em solução de Bouin.  
Coloração de Mallory,  
1200X.

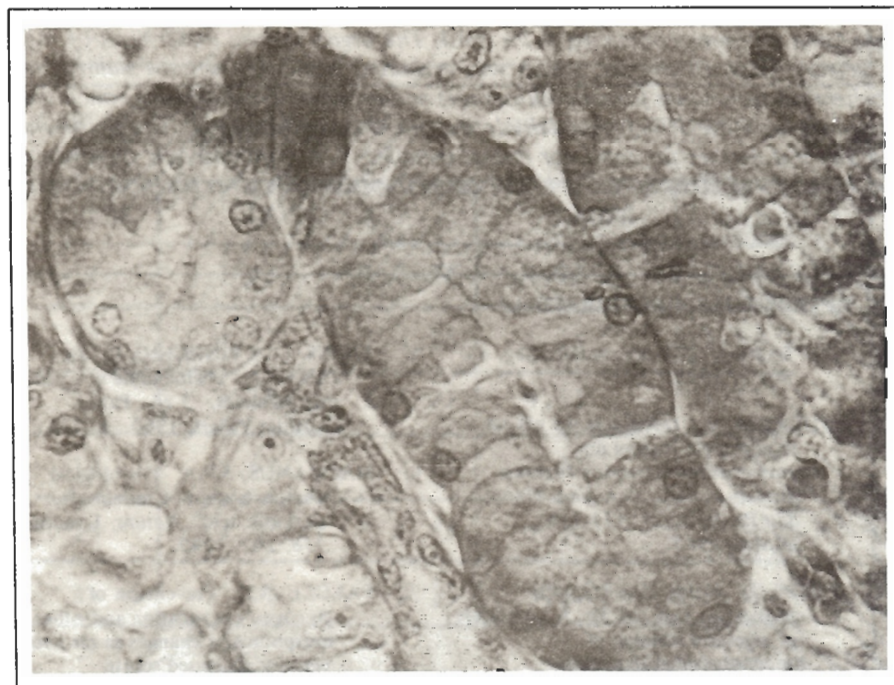
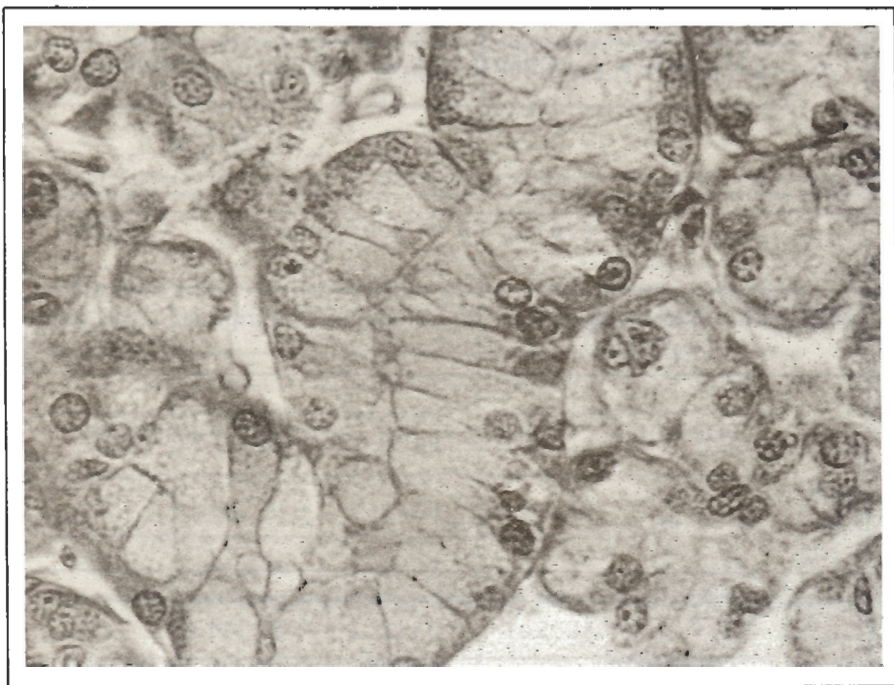


Fig. 4 —  
Material fixado  
em solução de Bouin,  
acrescida de NaCl a 0,7%.  
Coloração de Mallory.  
1200X.

## 3.3. Após as reações Histoquímicas

Os resultados estão expressos nas tabelas I, II e III, em que a intensidade de cor é traduzida em cruzes, sendo de quatro cruzes a indicação de máxima intensidade.

## 4 – CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento e da análise comparativa dos resultados obtidos com uso dos 4 (quatro) fixadores, parece-nos lícito concluir:

1. Tanto para o formol neutro como para a solução fixadora de Bouin, a adição de NaCl na concentração de 0,7% melhora sensivelmente a qualidade de fixação;

2. A solução fixadora de Bouin acrescida de NaCl a 0,7% resulta em melhor fixação geral para estudo morfológico, excetuando os ácinos e os grânulos dos ductos granulosos;

3. Para ácinos e ductos granulosos, considerados especialmente os grânulos destes, a melhor fixação é obtida através do formol neutro salino;

4. Para as reações histoquímicas, o formol neutro-salino é mais efetivo para a detecção do triptofano, com larga vantagem. O fixador de Bouin, com ou sem NaCl, não é indicado para pesquisa histoquímica de mucosubstâncias ou de proteínas.

TABELA I – Resultados da detecção histoquímica de mucosubstâncias neutras através de reação do P.A.S.

	FORMOL N.	FORMOL N./SAL	BOUIN	BOUIN/SAL
Ácino	+	++	+	+
D. gr.	++	++++	+	++
D. estr.	+	++	+	+

TABELA II – Resultados da detecção histoquímica de mucosubstâncias ácidas, através da reação do Alcian blue

	FORMOL N.	FORMOL N./SAL	BOUIN	BOUIN/SAL
Ácino	++	++	+	+
D. gr.	–	–	–	–
D. estr.	–	–	–	–

TABELA III – Resultados da detecção histoquímica do triptofano, pela reação do PABA.

	FORMOL N.	FORMOL N./SAL	BOUIN	BOUIN/SAL
Ácino	–	–	–	–
D. gr.	++	+++	–	–
D. estr.	–	–	–	–

## ABSTRACT

A comparative analysis of results obtained with different fixative solutions is presented. The fixatives used were neutral formaldehyde, conventional Bouin, and these same solutions containing 0.7% NaCl. The organ studied under each of these fixative conditions was the submandibular salivary gland of the rat, which was evaluated in paraffin sections stained with H-E and Mallory as well as by means of histochemical techniques for mucosubstances and proteins. The following conclusions are drawn: 1. An addition of 0.7% NaCl improves both the 10% formaldehyde and the Bouin fixatives; 2. The Bouin-NaCl fixative is good for general morphologic studies but neither for acini nor ductal granules; 3. For microscopic observations of acini and ductal granules the best fixative is the formaldehyde-NaCl; 4. The saline formaldehyde gives the most adequate fixation for histochemical techniques.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRGE, W.J. & TIBBITTS, F. D. The use of sodium chloride-containing fixatives in minimizing cellular distortion in histological and cytochemical preparations. *J. Histochem. Cytochem.*, Baltimore, 9:409 - 14, 1961.
- CARLETON, H.M. Note on the comparative effects on tissues of isotonic saline and distilled water when used as solvent for mercuric chloride and formol in histological fixation. *Q.J. microscops. Sci.*, 66: 501-8, 1922.
- GIUFRIDA, R. Influência do pH na fixação pelo formol dos grupamentos aminados (Estudo Histoquímico). *Rev. Fac. Odont., São Paulo*, 1 (2): 111-116, jul/dez. 1963.
- LISON, L. Alcian blue 8G with chlorantine fast red 5b. A technique for selective staining of mucopolysaccharides. *Stain Technol.*, 29: 131-8, 1954.
- LISON, L. & PINHEIRO, P. In: LISON, L. *Histochimie et Cytochimie animales*. 3 ed. Paris, Gauthier Villars, 1960, p. 732.
- MACMANUS, J.F.A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, London, 158: 202, 1946.
- PAEGLE, R.D. Prevention of glycogen polarization and other morphological changes in rat liver cells by increased solute concentration during formaldehyde

- fixation: a light and electron microscopic study. *Acta Histochem.*, 35: 1-17, 1970.
8. PIZA, I.G. & FAVA DE MORAES, F. Estrutura e histometria das glândulas salivares maiores do coelho (*Lepus cuniculus*, *Lepgomorpha*, *Mammalia*). *Rev. Fac. Odont., São Paulo*, 11 (1): 129-38, 1973.
9. ROSS, K.F.A. Cell shrinkage caused by fixatives and parafin-wax embedding in ordinary cytological preparation. *Q. J. microscops. Sci.*, 94 (pt. 2): 125-39, Jun., 1953.
10. WOLMAN, M. & GRECO, J. The effect of formaldehyde on tissue lipids and on histochemical reactions for carbonyl groups. *Stain Technol.*, 27 (6): 317-24, Nov., 1952.
11. YOUNG, J.W. Osmotic pressure of fixing solutions. *Nature*, 135 (3420): 823-4, May 18, 1935.
-